

学校编码: 10384

学号: 200226075

分类号 _____ 密级 _____

UDC _____

厦 门 大 学
硕 士 学 位 论 文

多种水解酶的荧光分析新方法研究

New Methods for Fluorescence Analysis of Enzymes

田 嘉 嘉

指导教师姓名: 李东辉 教授

专 业 名 称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2006 年 5 月

论文答辩时间: 2006 年 5 月

学位授予日期:

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2006 年 5 月

目 录

中文摘要.....	7
英文摘要.....	8
第一章	10
1. 酶的基本概念与发展史	10
2. 酶催化作用的特点与应用	10
2.1 酶在医药上的应用.....	10
2.2 酶在食品方面的应用.....	11
2.3 酶在工业上的应用.....	11
2.4 酶在环境保护方面的应用.....	12
3. 常用的酶检测方法.....	13
3.1 常用的蛋白酶检测方法.....	13
3.2 纤维素酶测定技术.....	15
3.3 淀粉酶的检测方法.....	16
4. 论文设想.....	16
5. 参考文献.....	18
第二章.....	25
1. 引言.....	25
2. 荧光各向异性的原理.....	25
3. 材料和方法.....	26
3.1 主要溶液及试剂配制.....	26
3.2 主要仪器及设备.....	27
3.3 实验方法.....	27
4. 结果与讨论.....	31
4.1 TMRITC 标记白蛋白的制备.....	31
4.2 罗丹明在不同 pH 介质中的荧光行为.....	31
4.2 反应体系的优化.....	32

4.3 蛋白酶的测定.....	36
4.4 抑肽酶对胰蛋白酶的抑制作用.....	38
4.5 回收率的测定.....	39
5. 结论.....	39
6. 参考文献.....	41
第三章.....	42
1. 引言.....	42
2. 材料和方法.....	43
2.1 主要溶液及试剂配制.....	43
2.2 主要仪器及设备.....	43
2.3 实验方法.....	44
2.4 纤维素酶活力的测定.....	44
3 结果与讨论.....	45
3.1 吡啶橙标记羧甲基纤维素.....	45
3.2 反应体系的优化.....	45
3.3 纤维素酶活力的测定.....	47
3.4 回收率的测定.....	48
4. 结论.....	48
5. 参考文献.....	49
第四章.....	50
1. 引言.....	50
2. 材料和方法.....	50
2.1 主要溶液及试剂配制.....	50
2.2 主要仪器及设备.....	51
2.3 实验方法.....	51
3. 结果与讨论.....	52
3.1 吡啶橙标记淀粉.....	52
3.2 体系的优化.....	53
3.3 淀粉酶活力的测定.....	54

3.4 回收率的测定.....	55
3.5 金属离子对反应的影响.....	55
4. 结论	56
5. 参考文献	57

厦门大学博硕士论文摘要库

Table of Content

Chinese Abstract	7
English Abstract	8
Chapter 1	10
1. Basic Concepts and History of Enzyme.....	10
2. Characteristic and Application of Enzyme Catalysis.....	10
2.1 Application of Enzyme in the Domain of Medicine	10
2.2 Application of Enzyme in the Domain of Food.....	11
2.3 Application of Enzyme in Industry.....	11
2.4 Application of Enzyme in Environment Protection.....	12
3. Common Methods of Measuring Enzyme	13
3.1 Common Methods of Measuring the Protease.....	13
3.2 Methods for the assay of Cellulase.....	15
3.3 Measuring Methods of the Amylase.....	16
4. Ideation of the Paper	16
5. Bibliography.....	18
Chapter 2	25
1. Introduction.....	25
2. Principles of Fluorescence Anisotropy.....	25
3. Materials and Methods.....	26
3.1 Reagents and Instruments.....	26
3.2 Instruments and Equipment	27
3.3 Experimental Procedures.....	27
4. Output and Discussion	31
4.1The preparation of TMRITC-BSA.....	31
4.2 Rhodamine in different Buffers.....	31
4.2 Optimization of the System.....	32
4.3 The Assay of Protease.....	36

4.4 Inhibition of Trypsin activity by Aprotini.....	38
4.5 Assay of Reclaiming Ration	39
5. Conclusion	39
6. Bibliography	41
Chapter 3.....	42
1. Introduction	42
2. Materials and Methods.....	43
2.1 Reagents and Materials.....	43
2.2 Instruments and Equipment	43
2.3 Experimental Methods.....	44
2.4 The Assay of Cellulase	44
3. Result and Discussion.....	45
3.1 Preparation of the Acridine Orange-Cellulose complex.....	45
3.2 Optimization of the System.....	45
3.3 The Assay of Cellulase.....	47
3.4 The Assay of Reclaiming Ration.....	48
4. Conclusion.....	48
5. Bibliography.....	49
Chapter 4.....	50
1. Introduction	50
2. Materials and Methods.....	50
2.1 Reagents and Materials	50
2.2 Instruments and Equipment.....	51
2.3 Experimental Methods	51
3. Result and Discussion	52
3.1 Preparation of the Acridine Orange-Amylum complex.....	52
3.2 Optimization of the System.....	53
3.3 The Assay of Amylase.....	54
3.4 The Assay of Reclaiming Ratio.....	55

3.5 The influence of metal ion	55
4. Conclusion.....	56
5. Bibliography.....	57

厦门大学博士论文摘要库

摘 要

本文共分为四章，包括：酶的应用与常用的测定方法综述；以罗丹明为标记物的蛋白酶荧光各向异性均相分析法；吖啶橙—纤维素复合物的制备及纤维素酶的荧光分析；吖啶橙—淀粉复合物的制备和淀粉酶的荧光分析。

第一章为前言，介绍酶在医药、食品、工业、环境保护等方面的实际应用与重要意义，评述了目前常用于检测酶的方法，并在此基础上提出了本论文的研究设想。

第二章主要研究以罗丹明为标记物的荧光各向异性法均相测定蛋白酶的方法。本章主要包括五个方面的内容：1.罗丹明—牛血清白蛋白复合物的制备；2.以罗丹明—牛血清白蛋白为底物在碱性条件下检测胰蛋白酶水解活力的研究；3.以罗丹明—牛血清白蛋白为底物在中性条件下检测菠萝蛋白酶活力的研究；4.以罗丹明—牛血清白蛋白为底物在酸性条件下检测胃蛋白酶活力的研究；5.实际药品的测定。相比以往的检测方法，本研究技术灵敏度高，受 pH 的影响小，拓宽了荧光各向异性技术在酶学分析中的应用范围。

第三章首次报道了以吖啶橙为探针的荧光光谱分析法测定纤维素酶的方法。本章主要包括两个方面的内容：1.吖啶橙—纤维素复合物的制备；2.以吖啶橙—纤维素为底物检测纤维素酶活力的研究。本研究原理简单，易于操作，灵敏度高（可检测到纳克级的酶量），实用性强。

第四章主要研究以吖啶橙为探针检测淀粉酶的荧光光谱分析法。本章主要包括两个方面的内容：1.吖啶橙—淀粉复合物的制备；2.以吖啶橙—淀粉为底物检测淀粉酶活力的研究；3.实际样品的测定。本方法灵敏度高、线性范围宽、实用性强。

关键词：荧光分析；酶；荧光探针

Abstract

This paper is consisted of four chapters, including the following aspects: Review on the application and the analysis methods of enzymes; The establishment of a homogeneous method for the determination of proteases using a fluorescent substrate prepared by TMRIC and BSA; The preparation of a acridine orange-cellulose complex and its application in the analysis of cellulase; The preparation of acridine orange-amylum complex and its application in the determination of amylase.

Chapter 1 is the preface, introducing practical applications of enzyme in various domains such as medicine, food, industry, environmental protection, etc. In this chapter we come up with the research program of this paper, on the basis of analysis and evaluation of some existing methods for the determination of enzymes.

Chapter 2 discusses the homogeneous analysis of proteases by fluorescence anisotropy technique, using rhodamine as the probe. This chapter is consisted of the following parts: (1) Preparation of the TMRITC-BSA; (2) Research on the measurement of Trypsin with TMRITC-BSA as the substrate in alkali environment; (3) Research on the measurement of Bromelain with TMRITC-BSA as the substrate in neutral medium; (4) Research on the measurement of Pepsin with TMRITC-BSA as the substrate in acidic medium; (5) A demo example for illustration purpose. Compared to other previous work, the present method is more independent of pH. Also it widens the application scope of fluorescent anisotropy technology in enzymology analysis area.

Chapter 3 presents the main ideas for the measurement of cellulase with acridine orange as the fluorescent probe for the first time. This chapter comprises the following contents: (1) Preparation of the complex of acridine orange and cellulose; (2) Research on the measurement of cellulase with the complex of acridine orange and cellulose as the substrate. Though the principle of this method is simple, but it provides high sensitivity (enzyme can even be measured at nanogram level) and high practicability.

Chapter 4 focuses on the measurement of amylase using acridine orange as a fluorescent probe. This chapter comprises the following contents: (1) Preparation of the acridine orange-amylum complex; (2) Research on the measurement of Amylase with the acridine-orange complex as the substrate; (3) A demo example for illustration purpose.

Key Words: Fluorescence analysis; Enzymes; Fluorescent Probe

第一章 前言

1. 酶的基本概念与发展史

酶是具有生物催化功能的生物大分子,按其化学组成,可以分为蛋白类酶(P酶)和核酸类酶(R酶)两大类。蛋白类酶主要由蛋白质组成,核酸类酶主要由核糖核酸(RNA)组成。

早在几千年前,人类就已经不自觉地利用酶的催化作用来制造食品和治疗疾病。据文献记载,我国在4000多年前就以经掌握了酿酒技术。在3000多年前就会制造饴糖、食酱等食品。然而,人们从19世纪30年代开始才真正认识酶的存在和作用。100多年来,人们对酶的认识经历了一个不断发展、逐步深入的过程。1833年,Payen和Persoz发现淀粉酶,初步触及了酶的一些本质问题。1902年,Henri提出中间产物学说,认为底物在转化为产物之前,必须首先与酶形成中间复合物,然后再转变为产物,并重新释放出游离的酶。1913年,Michaelis和Menton根据中间产物学说,推导出酶催化反应的基本动力学方程—米氏方程。1926年,Sumner证实酶的化学本质是蛋白质。1983年,Altman等人发现核糖核酸酶P的RNA具有催化活性,由此引出“酶是具有生物催化功能的生物大分子(蛋白质或RNA)”的新概念。

2. 水解酶催化作用的特点与应用

酶是生物催化剂,与非酶催化剂相比,具有专一性强,催化效率高和作用条件温和等显著特点。在一定条件下酶可以催化各种生化反应。所以酶在医药、食品、轻工、化工、环保等领域广泛应用。

2.1 酶在医药上的应用

蛋白酶可作为消炎剂,由于它能分解一些蛋白质和多肽,使炎症部位的坏死组织溶解,增加组织的通透性,抑制浮肿,促进病灶附近组织积液的排出并抑制肉芽的形成,因此具有很好的疗效,如木瓜蛋白酶^[1]。此外,蛋白酶还可用于多种疾病的诊断与治疗。糜蛋白酶可用来治疗白内障^[2-6]。胃蛋白酶可用于诊断胃溃疡,十二指肠溃疡,萎缩性胃炎以及胃癌等疾病的发生^[7,8]。胰蛋白酶可用于预防出血性肠坏死,增加存活率,还可用于检测急性胰腺炎等疾病^[9-11]。蛋白酶抑制剂广泛的应用于抵抗炎症、感染、病毒以及艾滋病、肿瘤的治疗中^[12-15]。血

清淀粉酶还可用于检测胰胆管异常以及呼吸衰竭等疾病^[16-19]。纤维素酶可治疗消化不良，食欲不振等疾病，改善便秘，胃胀的现象^[20-21]。

2.2 酶在食品方面的应用

纤维素酶在食品工业中应用广泛^[22-25]。在进行酒精发酵时添加纤维素酶可显著提高酒精和白酒的出酒率和原料的利用率。将纤维素酶应用于啤酒工业的麦芽生产中可增加麦粒溶解性，加快发芽，减少糖化液中单一葡萄糖含量，改进过滤性能，有利于酒精蒸馏。纤维素酶还可用于进行大豆、茶叶加工以及生产单细胞蛋白。蛋白酶对肌肉的肌动蛋白和胶原蛋白有很强的水解作用，食品工业上用它来处理肉类，可提高肉类的嫩度，使得口感更好；蛋白酶对啤酒还具有良好的澄清效果，用蛋白酶处理啤酒，不仅能够提高啤酒的澄清度、色度质量、蛋白质含量，而且能较长时间保持其澄清度效果及各指标的稳定性。这是因为蛋白酶使酒样中的大分子蛋白质分解生成了可溶于酒中且稳定的小分子多肽等物质，这有利于提高啤酒的品质和营养价值。蛋白酶应用于乳制品中还能加速乳的凝固，促进乳凝块的产生^[26-29]。将淀粉酶应用于面包的烘焙中可以改善面团特性，提高发酵性能，从而获得柔软性，稳定性更好的面团；还可赋予面包心良好的质地，防止面包老化，延长面包货架寿命^[30]。淀粉常被用于制造冷食品中，由于淀粉容易老化，因此食品常会出现生淀粉味，当加入淀粉酶后，使得淀粉水解成糊精，解决淀粉老化的问题，消除生淀粉味，而且还可适度增加淀粉用量，使得成本降低^[31-34]。

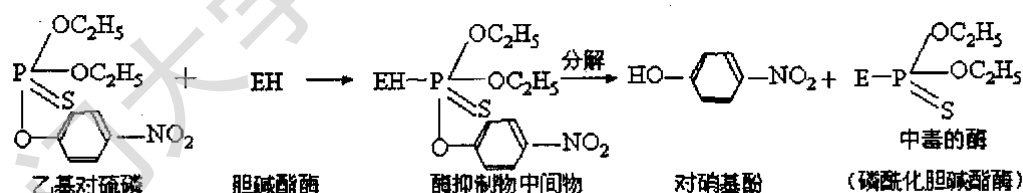
2.3 酶在工业上的应用

酶广泛用于制浆工业^[35-42]，Jacobs 等人研究了纤维素酶预处理硫酸盐法制浆。结果发现，酶处理后，纸浆卡伯值降低 10%，漂白时 ClO_2 消耗减少约 9kg/t 浆，纸浆强度性能与未经酶处理的相当，但粘度下降。王高升等人^[42]采用 3 种纤维素酶对非接触印刷废纸进行脱墨，结果表明，纤维素酶能促进油墨从纤维素上分离，改善非接触印刷废纸脱墨效果。经过脱墨后的纸张不但白度高、残留油墨量少、虑水性能好，而且具有优良的结合性能。酶在轻工业和化学工业方面有多种用途^[43-48]，用酶进行原料处理，用酶生产各种轻工、化工产品，用酶增强产品的使用效果：如在纺织工业中，为了增强纤维的强度和光滑性，便于纺织，需要先行上浆，将淀粉用 α -淀粉酶处理一段时间，使黏度达到一定的程度就可以用

作上浆的浆料，纺织品在漂白、印染之前，还需要将附着在其上的淀粉浆料等除去，利用 α -淀粉酶使淀粉浆料水解，就可以使浆料退尽，这称之为退浆。又如，有些纤维原料的表面附着一些短小纤维，用这种纤维制成的纺织制品外观质量受到一定的影响。采用纤维素酶处理，使表面的短小纤维水解除去，可以使纤维表面柔和、光滑、有光泽，显著提高制品的质量。再如，天然蚕丝的主要成分是不溶于水的有光泽的丝蛋白。丝蛋白表面有一层丝胶包裹着，在绞丝过程中必需进行脱胶处理，采用蛋白酶可在比较温和的条件下催化丝蛋白水解，进行生丝脱胶，从而使生丝的质量显著提高。

2.4 酶在环境保护方面的应用

人类的生产和生活与自然密切相关，地球环境由于受到各方面的影响正在不断的恶化，已经成为举世瞩目的重大问题。如何保护环境和改善环境质量是人类面临的重大课题。而酶在环保方面的应用已日益受到关注，呈现出良好的发展前景，主要应用于环境监测方面，废水处理方面，以及可生物降解材料开发方面。最近几十年农药的滥用造成了严重的环境污染，为了监测农药的污染，人们研究了多种方法，其中采用胆碱酯酶监测有机磷农药的污染就是一种具有良好前景的检测方法^[49-51]。有机磷农药是胆碱酯酶的一种抑制剂，可以通过检测胆碱酯酶的活性变化来判定是否受到有机磷农药的污染。以已基对硫磷为例，胆碱酯酶活性受到抑制的过程如下：



在处理工业废时，可以根据工业废水所含的物质采用不同的酶进行处理。如可利用酪氨酸酶从工业废水中除去酚类等物质^[52]，酪氨酸酶可以催化氧化单酚化合物 \rightarrow 邻苯二酚类化合物 \rightarrow 醌类化合物，后者在水溶液中不稳定，经过一系列酶催化和化学催化反应，自身聚合或与其它物质(有机胺类化合物等)聚合反应形成不溶于水的大分子物质而沉淀，因此酪氨酸酶不仅除去酚类物质，还能去除其它多种有机物，如有机胺、有机氮化合物等。

3. 常用的水解酶检测方法

3.1 常用的蛋白酶检测方法

3.1.1 荧光法和分光光度法

荧光法和分光光度法常用来检测以血红蛋白、荧光标记蛋白、发光染料标记的酪蛋白、胶原蛋白、明胶为底物的蛋白酶活性^[53-56]。先用蛋白酶水解底物，而后再将所生成的产物与底物分离，测其产物在上清的荧光强度或吸光度。所测得的荧光强度与吸光度与所加入的酶的活性成正比。一般而言，荧光法灵敏度较分光光度法高。这两种方法的主要缺点是：需在一定的时间间隔内取样，底物消耗量大；且产物与底物需完全分离，操作步骤多。

3.1.2 SDS凝胶电泳法

SDS-PAGE电泳常被用来检测各种蛋白酶^[57-58]。其基本原理为：聚丙烯酰胺凝胶中加入SDS和蛋白酶底物，SDS可使蛋白酶发生可逆变性。电泳完毕，用Triton X-100恢复凝胶中蛋白酶的活性，凝胶板置于蛋白酶反应缓冲液中进行酶解，而后再用考马斯亮蓝染色，最后脱色，紫外灯照射下，底物被酶解的部分会呈现亮带。带的亮度与蛋白酶的活性成正比。该方法，可以同时检测同一底物的酶，灵敏度也很高，但是时间耗费较长（约20h），而且每次胶的脱色程度不一样，重复性差。

3.1.3 放射性检测法

放射法是根据放射性标记的底物，经酶解后会产生放射性的产物的原理，来进行测量^[59-60]。所生成的放射性的产物的含量与酶的浓度成正比，由于底物与产物均含有放射性，所以在测量之前必须加以分离。这种方法可以检测到纳克级的酶量，灵敏度高，但是耗时长，有时需长达24小时才能获得满意的结果。此外，由于放射性同位素成本高、半衰期短、对人危害大、反应废物难以处理、反应程序复杂等原因使该法的应用受到了限制。

3.1.4 生物发光法与化学发光法

生物发光法^[61]主要是用基因重组的方式，得到一种含蛋白酶酶切位点的荧光蛋白。将荧光蛋白N末端生物素化，然后固定在亲合素包被的96孔板上，加入蛋白酶水解后，发光蛋白释放到溶液中，96孔板上剩余的生物荧光信号减弱，荧光信号减弱的程度与蛋白酶的活性有关。此方法检测时间较短，可在5分钟内完成。但是生物发光法的灵敏度明显不如化学发光法^[62]。此法所用的荧光底物需采用基

因工程技术制备，因而应用面有限。

Edwards等人1995年报道的化学发光法^[63]，在测定速度及检测限上有优势，但因需加入过氧化氢和起催化作用的钴离子，而使检测过程变长。

3.1.5 酶联法

Gutierrez^[64]等人设计了一个多肽，其中包含一生物素化的N末端，蛋白酶酶切位点和一C末端抗原表位。通过N末端生物素将其固定在用亲合素包被的微量滴定板上，加入蛋白酶反应后，去除释放的C末端，剩余的多肽底物与加入的抗C末端单抗结合，这些复合物将被此后加入的HRP标记的第二抗体IgG所识别。通过HRP酶促TMB显色，可定量分析样品中蛋白酶的活力。酶促反应显色后所产生的颜色变化间接和加入的目的蛋白酶活性有关。指示酶的加入扩大了反应信号，增加了反应的灵敏度，而且此方法适合自动化、高通量检测。Gan^[65]等人用此方法检测了胰蛋白酶、木瓜蛋白酶、胶原酶等的活性以及它们的抑制剂含量。

此种方法都需要蛋白酶水解后分解产物与底物，应此必须中止反应。用ANS作为标记物虽能够连续的检测酶解反应，但在较高背景干扰下，很难测得荧光的轻微下降。而且，一些酶并不作用于ANS结合于蛋白的位点。

3.1.6 自猝灭荧光法

自猝灭荧光法^[66, 67]是在蛋白底物上标记大量的荧光染料，使其荧光大部分被猝灭。蛋白酶水解后，荧光基团在水溶液中分散，使体系荧光强度上升。荧光强度的增强幅度与蛋白酶的活性成正比。此法操作简便，但是在标记蛋白时很难获得荧光的充分猝灭，而且受背景荧光的干扰较大，灵敏度和检测范围都因此而受到影响。

3.1.7 荧光共振能量转移

Latt^[68]等人合成了一段多肽连接荧光供体和受体，多肽中含有蛋白酶的酶切位点，维持这样的近距离可以发生由荧光供体向受体的能量转移，直接的表现就是供体产生的荧光强度比它单独存在时要低得多，当蛋白酶水解多肽后，荧光供体和受体分散到溶液中，其浓度不足以使它们的距离达到发生共振能量传递的范围内，供体荧光恢复，其增强的幅度与加入的蛋白酶的含量成正比。此法易于操作，可实现均相、实时分析；但需进行多肽合成，及荧光双标记，因而费用高。而且底物也非天然的，难以作为通用的蛋白酶检测法。

3.2 纤维素酶测定技术

3.2.1 椭圆偏光法

椭圆光谱^[69]学是一种利用线偏振光经样品反射后转变为椭圆偏振光这一性质以获得样品的光学常数的光谱测量方法。它区别于一般的反射投射光谱的最主要特点在于不直接测算光强，而是从相位空间寻找材料的光学信息，这一特点使这种测量具有极高的灵敏度。Jonny 等人利用椭圆偏光法检测纤维素酶作用于纤维素薄膜的过程，无需分离底物与产物，可以做到实时测定^[70]。然而，这种方法在具有较大背景噪声的红外波段难于实现。

3.2.2 分光光度法

Thomas K.^[71]等将纤维素用 Remazol Brilliant Blue 或 Ethylenediamine 等染料染色，作为酶解的底物。当水解反应达到平衡后，测其产物的吸光度值。吸光度值与所加入的酶量成正比。该方法的不足就在于：灵敏度不高，需分离底物与产物，若分离不完全还将干扰测定结果，底物用量也很大。

3.2.3 荧光光度法

William Helbert^[72]等人用氨基化荧光素（aminofluorescein）共价标记纤维素分子作为底物，检测纤维素酶的活力。待纤维素酶水解纤维素达到平衡后，测定体系的荧光强度值。此方法灵敏度欠佳，标记过程比较复杂，测定过程受背景荧光干扰较大。

3.2.4 液相色谱法

Jozsef Medve^[73]曾利用液相色谱法检测纤维素酶（主要是葡聚糖内切酶和葡聚糖外切酶）水解纤维素的反应体系，以确定参与反应的纤维素酶量与酶活力。液相色谱仪中带有阴离子交换套色版，当反应体系进入仪器内后，漂浮在溶液中的未参与反应的纤维素酶将被套色版所吸附，由已知加入的酶量与所测得的酶量可计算出参与反应的酶量。通过测定所生成的产物从而确定酶的活力。此方法可测到纳克级的酶量。但操作繁琐，耗费较高，较难应用于实际中。

3.3 淀粉酶的检测方法

3.3.1 凝胶扩散法与凝胶电泳法

Masoj P^[74]报道的测定 α -淀粉酶活性的凝胶扩散法是在直径约为 10cm 的培养皿中灌入沸腾的琼脂糖、淀粉混合物作为底物，冷却成胶后，均匀打孔，在孔

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库